

Beiträge zur Technik
der Spermatiefkühlung

Jürgen Unshelm

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. W. B a i e r

BEITRÄGE ZUR TECHNIK DER SPERMATIEFKÜHLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



von
Jürgen Unshelm
aus
Dortmund

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Z i p f

Referent: Prof. Dr. W. B a i e r

Tag der Promotion: 27. 2. 1959

"UNI - DRUCK", München 13, Amalienstraße 85

INHALT

Seite

A. EINLEITUNG	
B. METHODIK	2
C. LITERATUR UND EIGENE VERSUCHE	5
1. Abkühlgeschwindigkeit	5
2. Natriumzitatgehalt	7
3. Eidottergehalt	8
4. Verteilung des Eidotters auf Vor- und Nachverdünner	9
5. Zugabe des Nachverdünners	11
6. Adaptionszeit	12
7. Der Natriumzitatverdünner mit und ohne Glykokoll- zusatz im Vergleich zu Spermasol N und G sowie zum Magermilchverdünner (Molico)	13
D. ZUSAMMENFASSUNG	16
E. LITERATURVERZEICHNIS	18

Für das freundliche Überlassen des Themas
und die wohlwollende Förderung möchte ich
Herrn Prof. Dr. W. Baier meinen herzlichen
Dank aussprechen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Privat-
dozenten Dr. W. Leidl für seine wertvollen
Anregungen und Hinweise.

A. EINLEITUNG

Obwohl erst vor wenigen Jahren entdeckt wurde, daß Sperma durch Tiefkühlung lange Zeit lebens- und befruchtungsfähig zu erhalten ist, fehlte es nicht an Bemühungen, diese Technik seither noch weiter zu vervollkommen.

Die wesentlichste Schwierigkeit bildete dabei das Fehlen einer Methode, die es ermöglichte, sicher und ohne allzu große Zeitverluste festzustellen, ob durch eine veränderte Technik die unbestreitbare Schädigung des Spermas verringert werde. Denn das Warten auf Befruchtungsergebnisse ist bei der Unzahl von Besamungen, die erforderlich sind, um eine gewisse Sicherheit zu gewährleisten, entschieden zu zeitraubend, eine Kontrolle der Beweglichkeit der Spermien im Mikroskop erscheint selbst bei größter Routine als zu subjektiv, und auch eine Prüfung der äußersten Lebensdauer erfaßt nicht immer das Ejakulat in seiner Gesamtheit, sondern häufig nur das Überleben einzelner Samenzellen, die keiner Befruchtung mehr fähig sind.

Demgegenüber liefert die auch zur Überprüfung der Stoffwechselvorgänge beim Bullensperma schon mehrfach angewandte Methode nach Warburg ein Kriterium, das die unvermeidlich subjektiven Beobachtungen bei mikroskopischen Untersuchungen einschränkt, aber im Gegensatz zu Kontrollen der Befruchtungsraten auch weitgehende Bemühungen um eine Verbesserung der zur Zeit üblichen Tiefkühltechnik ermöglicht. Dieses Verfahren dürfte umsomehr zu befürworten sein, als es auch sehr geringe Unterschiede in der Behandlungsmethode genau registriert, was bei der Besamung aufgrund unvermeidlicher Fehlerquellen wie schlechtes Aufnehmen, Sterilität oder unterschiedliche Leistungen der Besamungstierärzte nicht möglich wäre. Und darum erscheint auch die Warburgmethode wie keine andere dazu geeignet, zur Verbesserung der bisherigen Tiefkühltechnik beizutragen. Diese Verbesserungsmöglichkeiten festzustellen und aufzuzeigen, ist Sinn und Zweck der vorliegenden Arbeit.

B. METHODIK

Über die Methodik sei nur Grundsätzliches zu Anfang gesagt, da die zahlreichen Abweichungen und Varianten im Zusammenhang mit den Berichten über die einzelnen Versuche verständlicher sein werden.

Das in meinen Versuchen verwendete Sperma stammte von vier Versuchsbullen der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, Ganz abgesehen von der nötigen Spermamenge für die Vielzahl der durchgeführten Versuche waren mehrere Bullen schon deshalb unbedingt erforderlich, um bei den Ergebnissen Mittelwerte der unzweifelhaft bestehenden individuellen Schwankungen beim Sperma verschiedener Bullen zu erhalten, da der Spermatieftkühlung in der Praxis mit dem Aufzählen von Ausnahmefällen kaum gedient sein könnte und diese Arbeit einzig und allein den Zweck verfolgt, zu einer Verbesserung der praktischen Tieftkühlmethoden beizutragen.

Nach dem Absamen der Bullen wurde dem Sperma, dessen Qualität und Dichte vorher bestimmt worden waren, ein Verdünnner im Verhältnis 1 : 3 zugesetzt, der aus einer 3,92 prozentigen Natriumzitratlösung ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 2 \text{H}_2\text{O}$) mit einem Zusatz von 30% Eidotter bestand. Diese Verdünnung erfolgte bei einer Temperatur von 20°C. Anschließend wurde das verdünnte Sperma langsam auf +5°C gekühlt. Danach wurde dem so verdünnten Sperma eine gleich große Menge Glycerinverdünner gleicher Temperatur in vier Einzeldosen innerhalb von zwei Stunden zugefügt. Dieser Nachverdünner gleicher Natriumzitratkonzentration enthielt je 20% Eidotter und Glycerinum DAB 6. Die Endkonzentration von Eidotter und Glycerin betrugen demnach 25 bzw. 10%.

Nach einer Adaptionszeit von 20 Stunden wurden - abhängig von der Zahl der erwünschten Behandlungsvarianten - bis zu vier 15 ccm-Kühlgefäße mit je 10 ccm verdünntem Sperma gefüllt. Diese relativ großen Kühlgefäße wurden verwendet, nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß sich alle Arbeitsmethoden einschließlich der Tieftkühlung auf das Sperma in diesen Gefäßen genauso auswirkten wie in den in praxi üblichen 1 ccm-Gläsern, deren Benutzung bei Versuchen dieser Art wesentlich umständlicher gewesen wäre.

Die anschließende Tiefkühlung erfolgte in einem Alkohol-Trockeneis-Gemisch. Es wurde von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -15°C in 2 Minuten um 1°C gekühlt und von -15°C bis -79°C in 1 Minute um 1°C . Die Temperaturkontrolle erfolgte durch ein miteingefrorenes Thermometer (Thermonadel und Lichtstrichgalvanometer).

Aufgetaut wurde frühestens 24 Stunden nach dem Einfrieren. Dazu wurde das gefrorene Sperma 30 Sekunden lang der Zimmertemperatur (20°C) ausgesetzt, wobei die Temperatur um etwa 30°C stieg, und anschließend bis zum völligen Auftauen in ein Wasserbad von 38°C (500 ccm-Becherglas) gegeben.

Danach begann sofort das Messen des Sauerstoffverbrauches. Wie beschrieben stand vom gleichen Ejakulat - abgesehen von den bis zu vier Varianten einer Behandlungsmethode - gleich vorbehandeltes Sperma zur Verfügung. Der Sauerstoffverbrauch wurde viertelstündlich bei $+38^{\circ}\text{C}$ und einer Schüttelfrequenz von 80/min zwei Stunden lang abgelesen.

Zum richtigen Verständnis der später angeführten Ergebnisse sei schon vorher klargelegt, daß sich mit dieser Methode niemals die Befruchtungsfähigkeit selbst ermitteln läßt, sondern stets nur der Grad der Schädigung des Spermas durch die Verfahren, denen es ausgesetzt wurde. Dabei müssen Methoden, die hinsichtlich ihrer Zweckmäßigkeit miteinander verglichen werden sollen, immer gleichzeitig, d.h. im gleichen Warburgversuch angewendet werden, mit anderen Worten, die Zahlenwerte sind relativ, ein absoluter Vergleich von Ergebnissen verschiedener Versuche ist nicht möglich. Für die Auswertung der Versuche wurde jeweils der höchste Grad der Schonung des Spermas = 100% gesetzt; bei den Varianten dazu wurde der Prozentsatz der Schonung im Verhältnis zum optimalen Verfahren innerhalb des gleichen Versuches angegeben.

Jeder Versuch wurde mit dem Sperma verschiedener Bullen durchgeführt und mehrmals wiederholt, um Zufallsergebnisse auszuschließen. Bei den Ergebnissen handelt es sich also um Durchschnittswerte einer Versuchsreihe.

Über die Technik und Berechnung der Warburgmethode wurde schon mehrfach - auch hinsichtlich der Spermakonservierung - geschrieben (8, 21), so daß sich nähere Angaben darüber wohl erübrigen.

Bei folgenden in der Literatur noch umstrittenen und in der Praxis noch unterschiedlich gehandhabten Behandlungsarten wurden mit Hilfe der manometrischen Methode nach Warburg die optimalen Werte festgestellt:

1. Abkühlgeschwindigkeit
2. Natriumzitatgehalt
3. Eidottergehalt
4. Verteilung des Eidotters auf Vor- und Nachverdünner
5. Zugabe des Nachverdünners
6. Adaptionzeit
7. Der Natriumzitatverdünner mit und ohne Glykokollzusatz im Vergleich zu Spermasol N und G sowie zum Magermilchverdünner (Molico)

Die optimalen Werte für die Glyzerinkonzentration (7,5 %) und die Auftemperatur (0 - 5°C) wurden mit der gleichen Methode schon ermittelt. (Leidl - Rüsse (21) bzw. mündliche Angaben von Leidl)

C. LITERATUR UND EIGENE VERSUCHE

1. Abkühlgeschwindigkeit

Über die zellschädigenden Einflüsse während des Abkühlvorganges sind die Meinungen geteilt. Bequerel - zit. von Schiller (28) - vertritt die Auffassung, daß die Schädigung des Spermas von der Größe der sich in der Zelle bei der Abkühlung bildenden Eiskristalle abhängt. Der Zusatz von Glycerin bewirkt seiner Meinung nach eine Dehydrierung der Zelle, wodurch ein größeres Auftreten von Eiskristallen vermieden werde. Da die restlichen Eiskristalle bei der sogenannten Ultra-Rapid-Kühlung am kleinsten bleiben - so folgert er -, muß diese Art der Abkühlung die schonendste sein.

P o l g e (22) dagegen bestreitet eine Schädigung rein mechanischer Art. Er vermutet, daß nach dem Ausfrieren des Wassers aus dem Medium die dadurch entstehende Konzentration der in der Zelle zurückbleibenden Elektrolyte einen toxischen Zelltod bedingt. Daß die Salzkonzentration unterhalb der toxischen Grenze bleibe, sei auf den Einfluß des Glycerins als "Salzpuffer" zurückzuführen. Eine extrem schnelle Abkühlung hält er nicht für angebracht.

Vielseitige Vermutungen über das Optimum der Abkühlgeschwindigkeit werden in der Literatur angegeben. Dabei wird der Abkühlvorgang fast immer in zwei Phasen unterteilt, nämlich in die, mit der ein Festfrieren des Spermas erreicht wird (etwa -12 bis -15°C), und in den sich daran anschließenden Abschnitt des Weiterkühlens auf -79°C .

Fast immer wird der Standpunkt vertreten, daß die Geschwindigkeit bis -15°C geringer sein müsse als nach dem Festfrieren des Spermas. Bei näherer Betrachtung lassen sich bezüglich der Durchführung der ersten Phase drei Richtungen in den Auffassungen erkennen, nämlich die, der die relativ geringe Abkühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/2$ min die beste zu sein scheint (21, 24), eine zweite, die sich für ein etwas schnelleres Abkühlen, etwa $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ausspricht (6, 10, 11, 12, 13, 22, 32, 33), und die dritte, die zu einer noch schnelleren Abkühlung von etwa $2 - 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rät (5, 23). Ähnlich verhält es sich mit den Meinungen über die Behandlung des Spermas während der zweiten Phase, für die mittlere Geschwindigkeiten - $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - (21, 32), schnellere Abkühlungen - mindestens $2 - 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - (6, 10, 11, 13, 22, 23) oder Sturzkühlungen (5, 12, 33) empfohlen werden.

Bei meinen Versuchen prüfte ich zuerst den Einfluß von Sturzkühlungen auf das Sperma. Dazu verdünnte und kühlte ich vier Spermaproben nach der beschriebenen Methode. Eine der Proben wurde normal bis -79°C gekühlt, die drei anderen wurden jeweils bei -15°C , -45°C und -60°C aus dem gemeinsamen Thermosbehälter genommen und in ein Alkohol-Trockeneis-Gemisch von -79°C gebracht.

Bekanntlich bestehen Unklarheiten über den Begriff der "Sturzkühlung". Als solche bezeichnet man nämlich sowohl das Eintauchen des verdünnten Spermas in ein Kältegemisch von -79°C als auch ein sehr stark forciertes Zugeben von Kohlensäureeis. Vergleichende Untersuchungen hierüber ergaben, daß Spermaproben, die auf -15°C gekühlt waren, durch beide Methoden die Endtemperatur von -79°C in etwa 4 Minuten erreichen.

Diese ersten Versuche beweisen, daß Sperma durch Sturzkühlungen mehr geschädigt wird als durch eine langsamere Abkühlung. Bemerkenswert erscheint dabei noch, daß durch die Sturzkühlungen bei -15°C 87,1 %, bei -45°C 87,9 % und bei -60°C 92,2% des Sauerstoffbedarfs der normal gekühlten Spermaprobe verbraucht wurden. Das bedeutet, daß selbst bei -60°C noch eine Schädigung des Spermas durch Sturzkühlung oder unvorsichtiges Abkühlen möglich ist.

Durchschnittszahlen aus 7 Versuchen ergaben hinsichtlich des O_2 -Verbrauches in mm^3 von 10^9 Spermien:

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
Norm. Tiefk.	79	37	116 = 100,0 %
Stk. -15°C	66	35	101 = 87,1 %
Stk. -45°C	67	35	102 = 87,9 %
Stk. -60°C	71	36	107 = 92,2 %

Als nächstes untersuchte ich die in der Literatur genannten Abkühlgeschwindigkeiten auf ihre Zweckmäßigkeit. Wie schon erwähnt, kann man mit dem mir zur Verfügung stehenden Gerät bei ausreichender Genauigkeit der Ergebnisse nur vier Varianten gleichzeitig überprüfen. Deshalb war ich gezwungen, in mehreren Versuchsreihen jeweils vier Abkühlgeschwindigkeiten miteinander

zu vergleichen, von denen dann die drei schlechteren für weitere Untersuchungen ausschieden. Durch einen abschließenden Vergleich der besten Ergebnisse aus den Vorversuchen stellte ich fest, daß die Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute durchgehend von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C eine Schädigung des Spermas am ehesten ausschließt. Diese Methode stellt gegenüber dem einleitend beschriebenen Verfahren eine Verbesserung um 7,7 % dar.

2. Natriumzitratgehalt

Bei den Angaben über den Natriumzitratgehalt des Eidotter-Zitrat-Verdünners wird von den meisten Autoren die Tatsache nicht genügend berücksichtigt, daß es mehrere handelsübliche Arten von Natriumzitat gibt, die sich durch ihren Gehalt an Kristallwasser unterscheiden. Im deutschen Handel ist Natriumzitat mit einem Kristallwassergehalt von 2 Mol ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$) und 5,5 Mol ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 5,5\text{H}_2\text{O}$) erhältlich. Für das Natriumzitat mit 5,5 Mol H_2O ist vereinzelt auch die Schreibweise $2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 11\text{H}_2\text{O}$ anzutreffen. Die beiden einzigen Angaben hierüber, die mir zugänglich waren, stammen von Hildebrand (14), der angeblich Natriumzitat mit der Formel $2\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 11\text{H}_2\text{O}$ benutzte, und Henderson (13), der für die Spermaverdünnung $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$ empfiehlt. Eine derartige Formel ist jedoch nur möglich, wenn man bei dem tertiären Natriumzitat ein Na Atom gegen ein H-Atom austauscht. Es entsteht dann die Formel $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$. Die genannten Autoren hätten dann aber wahrscheinlich hinzugefügt, daß es sich dabei nicht um das übliche tertiäre, sondern um sekundäres Natriumzitat handle.

Unter diesen Umständen ist ein Vergleich der angegebenen Werte schwierig. Es dürfte jedoch nicht uninteressant sein, die enormen Unterschiede in den Angaben über das vermutete Optimum der Natriumzitratkonzentration zu erwähnen. In der Literatur wird nämlich zu Konzentrationen von 2,0 - 2,2 % (22), 2,5 % (6), 2,8 % (29, 31), 2,9 % (2, 5), 3,92 % (21), 4,5 % bei 5,5 Mol H_2O (3, 4, 9, 14, 15, 26, 34), 4,76 % (27) und 4,8 % (18) geraten. Diese Zahlen lassen erkennen, daß gerade auf diesem Gebiet Untersuchungen über das wirkliche Optimum der Natriumzitratkonzentration nötig sind.

Meine Versuche erstreckten sich analog den vorher geschilderten Untersuchungen zunächst über die relativ große Spanne der Konzentrationen zwischen 0 und 6 %. Da hiernach das gesuchte Optimum zwischen 2 und 3,5 % liegen mußte, forschte ich innerhalb dieser Grenzen weiter und ermittelte für Natriumzitat mit 2 Mol Kristallwasser eine optimale Konzentration von 2,5 %, was gegenüber der anfangs benutzten Konzentration von 3,92 % einer Verbesserung um über 25 % gleichkam. Der entsprechende Wert für Natriumzitat mit 5,5 Mol Kristallwasser ist nach meinen Untersuchungen 3,2 %.

Durchschnittszahlen aus je 4 Versuchen

(0₂-Verbrauch in mm³ von 10⁹ Spermien)

2 Mol H ₂ O	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
2,0 %	166	81	247 = 84,3 %
2,5 %	192	101	293 = 100,0 %
3,0 %	168	80	248 = 84,6 %
3,5 %	147	71	218 = 74,4 %
2,3 %	129	51	180 = 94,3 %
2,5 %	136	57	193 = 100,0 %
2,7 %	130	51	181 = 93,8 %

5,5 Mol H₂O

3,0 %	98	45	134 = 97,3 %
3,2 %	102	45	147 = 100,0 %
3,4 %	96	44	140 = 95,2 %

3. Eidottergehalt

Eine ähnliche Unterschiedlichkeit der Meinungen, wie wir sie bei den Fragenkomplexen der Abkühlgeschwindigkeit und der Natriumzitratkonzentration sahen, tritt auch bei der Diskussion über den optimalen Eidottergehalt zutage.

Daß ein Eidotterzusatz die meisten Spermaverdünner, besonders für die Tiefkühlung, wesentlich verbessert und damit eigentlich erst praxisreif macht, dürfte seit einigen Jahren feststehen. Die Frage nach dem "Warum" ist jedoch noch ungeklärt. Theorien, die besagen, das im Eidotter enthaltene Lezithin mindere den Kälteschock, sind noch nicht restlos bewiesen.

Aber wie hoch soll nun dieser Eidotterzusatz sein? 10 % sind das Mindeste, was hierzu angegeben wird (3, 15, 20, 26, 30). Meistens wird ein höherprozentiger Zusatz empfohlen, 15 - 20 % (22), 20 % (4, 10, 16, 31) oder am häufigsten 25 % (2, 6, 12, 13, 17, 21). Anderslautende Vorschläge - bis zur gleichen Menge Eidotter wie Natriumzitratverdünner (27) - sind selten.

Bei diesen Versuchen wandte ich das gleiche Verfahren an wie bei der Untersuchung der Natriumzitratkonzentrationen, d.h. ich schuf mir eine breite Basis dadurch, daß ich auch unwahrscheinliche Möglichkeiten wie 0 oder 50% in meinen Versuchsplan einbezog. Wie bei den letzten Versuchen schon beschrieben, konnte ich so die Grenzen der noch möglichen Konzentrationen immer enger ziehen, so daß ich abschließend mit 20 % Eidotterzusatz den günstigsten Prozentsatz feststellte. Das ist gegenüber dem ursprünglich 25%igen Eidotterzusatz ein Fortschritt, der die Atmungsintensität des Spermas um etwa 7 % steigen ließ.

Durchschnittszahlen aus den 3 Abschlußversuchen

(O₂-Verbrauch in mm³ von 10⁹ Spermien)

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
15 %	206	79	285= 92,8 %
20 %	225	82	307=100,0 %
25 %	207	80	287= 93,5 %

4. Verteilung des Eidotters auf Vor- und Nachverdünner

Während es sich bei der Abkühlgeschwindigkeit ebenso wie bei dem Natriumzitrat- und Eidottergehalt um recht umstrittene Teilgebiete der Spermatiefkühlung handelte, komme ich jetzt zur Besprechung eines Problems, das von

den meisten Autoren gar nicht erst angeschnitten wurde, da man seine Lösung zu kennen glaubte, oder vielleicht auch, weil man ihm keine große Bedeutung beimaß. Es ist z. Zt. noch üblich, den sogenannten Nachverdünner (Glyzerinverdünner) mit dem gleichen Eidotterzusatz herzustellen, den auch der Vorverdünner enthält. Überraschend ist deshalb die Angabe von Rowson und Hunter - zit. von Urbaschek und Zoder (33) -, die als Nachverdünner ein Natriumzitrat-Glycerzin-Gemisch ohne Eidotterzusatz benutzten.

Da diese Auffassung eine genauere Untersuchung dieses Problems ratsam erscheinen ließ, verdünnte ich dazu drei Spermaproben in der angegebenen Weise, die sich nur in der Verteilung des Eidotters auf Vor- und Nachverdünner unterschieden. Bei der ersten der drei Proben kam der gesamte Eidotterzusatz in den Vorverdünner, der Nachverdünner war also eidotterfrei. Bei der zweiten Probe war es genau umgekehrt, d.h. der Eidotter gelangte in den Nachverdünner, so daß der Vorverdünner eidotterfrei blieb. Bei der dritten Probe verteilte ich die erforderliche Eidottermenge je zur Hälfte auf beide Verdünner.

Daß derartige Untersuchungen durchaus angebracht waren, bestätigte das Ergebnis die erste Probe wies den höchsten Sauerstoffverbrauch auf. Er lag dabei um 9 % höher als bei der zweiten Probe und sogar um 15 % höher als bei der dritten, die das z. Zt. allgemein angewandte Verfahren darstellt.

Durchschnittszahlen aus 8 Versuchen

(O₂-Verbrauch in mm³ von 10⁹ Spermien)

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
Eid. im Vorverd.	243	91	334=100,0 %
Eid. im Nachverd.	225	81	306= 91,6 %
Eid. auf Vor- und Nachverd. verteilt	202	80	282= 84,4 %

5. Zugabe des Nachverdünners

Die unterschiedlichen Methoden bei der Zugabe des Nachverdünners werfen neue Fragen auf: darf man das Sperma der Gesamtmenge des Glyzerinverdünners ohne Übergang aussetzen? Ist vorsichtiges Dosieren hierbei zweckmäßiger, oder sind vielleicht die ständigen "Beunruhigungen" des Spermas durch das immer wieder erfolgende Zugeben des Nachverdünners noch schädlicher?

Bisher erfolgt die Zugabe des Nachverdünners ausnahmslos fraktioniert. Zeit und Zahl der Dosierungen sind dabei jedoch verschieden. So verteilten **Leidl** und **Rüsse** (21) den Nachverdünner auf vier Einzeldosen, die sie in Abständen von 30 Minuten zu dem vorverdünnten Sperma gaben. Ein Zugabe des Nachverdünners in zwei Dosen innerhalb von 30 Minuten empfehlen **Cragle**, **Myers**, **Waugh**, **Hunter** und **Anderson** (5). Zu einer Verteilung auf 5 Dosen, die ebenfalls innerhalb einer halben Stunde zugegeben werden, raten **Hafs** und **Elliott** (12). **Grootenhuis** (11) schlägt vor, die Vermengung der beiden Verdüner so langsam erfolgen zu lassen, daß sie erst nach einer Stunde abgeschlossen sei. Die gleiche Anregung kommt von **Rowson** und **Hunter**, zit. nach **Urbaschek** und **Zoder** (33).

Bei meinen Versuchen verglich ich die Einflüsse drei verschiedener Nachverdünnungsmethoden auf den Sauerstoffverbrauch des hierbei benutzten Spermas und zwar

1. Zugabe des gesamten Nachverdünners
2. Zugabe des Nachverdünners in zwei Dosen halbstündlich
3. Zugabe des Nachverdünners in vier Dosen viertelstündlich

Die Auswertung dieses Versuches zeigte folgendes Bild:

Sauerstoffverbrauch nach der ersten Methode = 100 %

Sauerstoffverbrauch nach der zweiten Methode 94 % der 1. Methode

Sauerstoffverbrauch nach der dritten Methode 84 % der 1. Methode

Das fraktionierte Zugeben des Nachverdünners ist danach unzulässig.

Durchschnittszahlen aus 6 Versuchen

(O₂-Verbrauch in mm³ von 10⁹ Spermien)

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
1. Methode	211	78	289=100,0 %
2. Methode	196	76	272= 94,1 %
3. Methode	176	68	244= 84,4 %

6. Adaptionszeit

Unter der Adaptionszeit versteht man den Zeitraum, der zwischen der Zugabe des Nachverdünners und der Tiefkühlung liegen soll, um die noch ungeklärte Wirkung des Glyzerins auf die Kälteverträglichkeit des Spermas zu gewährleisten.

Über die Adaptionszeit ist schon viel gesagt und geschrieben worden, was normalerweise ein untrügliches Zeichen für die Unterschiedlichkeit der Auffassungen ist. Die Meinungen über das Optimum dieser Anpassungszeit der Spermien an das hinzugegebene Glyzerin schwanken zwischen 4-5 (6) und 24 Stunden (10, 32), wobei noch dazwischenliegende Werte wie 6 (22), 8 (11), 14 (21), 14,9! (5), 18 (12, 25), 18-20 (13) und 20 Stunden (7) angegeben werden.

Das Optimum der Adaptionszeit stellte ich folgendermaßen fest: zunächst verdünnte ich wiederum vier Spermaproben wie einleitend angegeben. Eine der Proben kühlte ich sofort nach Zusatz des Nachverdünners, die drei übrigen jeweils 10, 20 und 30 Stunden später. Den höchsten Sauerstoffverbrauch stellte ich nach einer Adaptionszeit von 10 Stunden fest; die drei anderen Spermaproben erreichten im Verhältnis zu diesem optimalen Wert folgenden Sauerstoffverbrauch:

keine Adaptionszeit	88 %
Adaptionszeit von 20 Std.	89 %
Adaptionszeit von 30 Std.	73 %

Da die Proben mit einer Adaptionszeit von 20 Stunden und einer fehlenden Anpassungszeit etwa: den gleichen Sauerstoffverbrauch aufweisen, muß das

Optimum der Adaption zeitlich genau dazwischen liegen. Dadurch erübrigen sich weitere Untersuchungen auf einen noch genaueren Wert des Ergebnisses.

Durchschnittszahlen aus 4 Versuchen

(O₂-Verbrauch in mm³ von 10⁹ Spermien)

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
0 Std.	141	53	194= 88,2 %
10 Std.	163	57	220=100,0 %
20 Std.	141	54	195= 88,6 %
30 Std.	118	43	161= 73,2 %

7. Der Natriumzitatverdünner mit und ohne Glykokollzusatz im Vergleich zu Spermasol N und G sowie zum Magermilchverdünner (Molico)

Trotz recht guter Erfahrungen mit den Natriumzitatverdünnern versuchten verschiedene Firmen in den letzten Jahren, noch bessere Sperma verdünnungsmittel auf den Markt zu bringen. Während die meisten dieser Produkte hinsichtlich der praktischen Verwendung keine große Bedeutung erlangten, wurden die Spermasolverdünner der Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen, immer wieder erprobt und fast ausnahmslos dem konservativen Natriumzitatverdünner vorgezogen (1, 4, 14, 15, 18, 19, 34).

Schlechter dagegen waren die Ergebnisse bei der Verwendung sogenannter Magermilchverdünner, die meist aus Milchpulver hergestellt wurden. So wurden auch schon Versuche mit einem Verdünnungsmittel aus dem Molico-Milchpulver der Firma Nestle, ebenfalls nach der Warburgmethode, durchgeführt (8). Auch aus diesen Untersuchungen ging die Überlegenheit anderer Verdünnungsmittel gegenüber den Magermilchverdünnern hervor.

Es fehlten jedoch bisher vergleichende Angaben über die Brauchbarkeit dieser Verdünnungsmittel bei Tiefkühlsperma.

Aus diesem Grunde verglich ich die Verwendungsmöglichkeiten folgender Verdünner:

1. Natriumzitrat nach der in dieser Arbeit beschriebenen neuen Methode
2. Natriumzitrat nach der alten Methode (siehe unter "Methodik")
3. Natriumzitrat, neue Methode mit Zusatz von 1,5 % Glykokoll
4. Spermasol N, neue Methode
5. Spermasol N, alte Methode
6. Spermasol G, neue Methode
7. Spermasol G, alte Methode
8. Molico-Verdüner 9%ig, 10 % Eidotter

Bei dieser Zusammenstellung fällt auf, daß diese Angabe die Möglichkeiten, welche die Warburgmethode bietet, eigentlich überschreitet, da hierbei 8 Verdüner miteinander verglichen werden. Das war nur dadurch möglich, daß ich den Sauerstoffverbrauch unter dem Einfluß der verschiedenen Verdüner in ein prozentuales Verhältnis zur Atmungsintensität des mit Natriumzitrat (neue Methode) verdünnten Spermas setzte.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß der Molico-Verdüner und ein Zusatz von Glykokoll zum Natriumzitrat keine Verbesserung der üblichen Verdünnungsmethoden darstellen würde. Dabei ist jedoch eine geringe Leistungssteigerung durch den Zusatz von Glykokoll nach der ersten Stunde unverkennbar, deren praktische Bedeutung aber nur beim Spermasol G zu suchen sein wird. Gegen die Spermasolverdüner sprechen die enormen individuellen Schwankungen, die beim Natriumzitratverdünner längst nicht dem Maße anzutreffen sind. Aus diesem Grunde wäre das Argument, Natriumzitrat eigne sich für den Routinebetrieb eher, nicht unbedingt von der Hand zu weisen.

Durchschnittszahlen aus 27 Versuchen

(O_2 -Verbrauch in mm^3 von 10^9 Spermien)

	in d. 1. Std.	in d. 2. Std.	in 2 Std.
1. Natriumzitrat neu	297	115	412=100,0 %
2. Natriumzitrat alt	221	97	318= 77,2 %
3. Natriumzitrat neu mit Glyk.	256	114	370= 89,8 %

	in d.1. Std.	in d.2. Std.	in 2 Std.	
4. Spermas. N neu	325	127	452=109,7 %	1)
5. Spermas. N alt	270	101	371= 90,1 %	2)
6. Spermas. G neu	337	150	487=118,2 %	3)
7. Spermas. G alt	281	108	389= 94,4 %	4)
8. Molico	216	85	301= 73,1 %	

- | | | |
|----|---------------------------|--------------|
| 1) | mit Schwankungen zwischen | 92 und 115 % |
| 2) | " " " | 79 und 94 % |
| 3) | " " " | 94 und 124 % |
| 4) | " " " | 83 und 98 % |

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit der manometrischen Methode nach Warburg wurden optimale Werte für die Behandlung von Tiefkühlsperma ermittelt.
2. Die geringste Schädigung des Spermas ist durch eine Abkühlungsgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durchgehend von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C zu erreichen.
3. Das Optimum des Natriumzitratgehaltes beträgt 2,5 % bei N.Z. mit 2 Mol Kristallwasser und 3,2 % bei N.Z. mit 5,5 Mol Kristallwasser.
4. Bei einem Eidotterzusatz von 20 % war der höchste Sauerstoffverbrauch des Spermas festzustellen.
5. Mit eidotterfreien Nachverdünnern wurden bessere Ergebnisse erzielt als mit eidotterhaltigen.
6. Die Zugabe des Nachverdünners hat zweckmäßigerweise unfractioniert zu erfolgen.
7. Eine Adaptionszeit von 10 Stunden ist optimal.
8. Verdünnungen mit Spermasol N und besonders mit Spermasol G ergeben bessere Resultate als Verdünnungen mit Natriumzitrat, Natriumzitrat mit Glykokollzusatz (1,5 %) sowie Magermilchverdünner (Molico) brachten schlechtere Ergebnisse.

S u m m a r y

1. Optimal levels of deep-frozen sperm were determined by Warburg's manometric method.
2. Least damage is done to the sperm if cooling is performed at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from plus 5°C to minus 79°C .

3. Optimal concentration of sodium citrate is 2,5 % for sodium citrate with 2 mols of water of crystallization and 3,2 % for sodium citrate with 5,5 mols of water of crystallization.
4. Oxygen consumption of sperm was highest when 20 % of egg yolk were added.
5. Second diluters without egg yolk gave better results than such containing egg yolk.
6. It is advisable to use non-fractional second diluters. .
7. The best adaption period is 10 hours.
8. Dilutions with Spermasol N and even more so with Spermasol G give better results than dilution with sodium citrate. Sodium citrate to which glycocoll was added (1,5 %) and skin-milk-diluents (Molico) gave less good results.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aehnelt, E. (1951): Vergleichende experimentelle Prüfung der Sperma-
verdünner Eidotter-Spermasol, Eidotterziträt
und Sp. V. 161
Deutsche Tierärztl. Wochenschrift, Beil. 1, 34.
2. Bonadonna, T. (1955): Verwendungsmöglichkeiten von tiefkühlkonser-
viertem Bullensperma in den tropischen Ländern.
Deutsche Tierärztl. Wochenschrift 43/44,
Beil. 11, 131.
3. Brennecke, E. (1951): Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas.
Diss. Hannover
4. Bücken, H. (1954): Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß
verschiedener Verdünnungsgrade und Eidotterzu-
sätze auf das Bullensperma im Reagenzglas.
Diss. Hannover
5. Cragle, R. G., Myers, R. M., Waugh, R. K., Hunter, J. S., Anderson, R. L.
(1955): The effects of various levels of sodium citrate,
glycerol, and equilibration time on survival of
bovine spermatozoa after storage at -79°C .
Jour. of Dairy Sci., 38, 508.
6. Eibl, K. und Zoder, H. F. (1955): Zur Technik der Samentiefkühlung.
Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 31/32,
Beil. 8, 88.
7. Emmens, C. W. und Blackshaw, A. W. (1955): The fertility of frozen ram and bull semen.
Austral. Vet. J. 31, 76
8. Greiff, W. (1957): Untersuchungen über die Verwendung von
Trockenmilch und Glykokoll in der Samen-
pufferung.
Diss. München

9. Grommes, H. (1953): Untersuchungen über den Temperaturschock bei der Verdünnung des Bullenspermas.
Diss. Hannover.
10. Groot, de B. (1952): De invloed van glycerol op het conserveren van stiersperma bij lage temperaturen (-79°C).
Tijdschr. Diergeneesk. 77, 892.
11. Grootenhuis, G. (1953): Over de toepassing van het diepvriezen van sperma in de praktijk
Tijdschr. Diergeneesk. 78, 861.
12. Hafs, H. D. und Elliott, F. I. (1955): The effect of methods of adding egg yolk and monosaccharides on the survival of frozen bull spermatozoa.
Jour. of Dairy Sci. 38, 811.
13. Henderson, J. A. (1956): in Diseases of cattle
American Veterinary Publications, Inc.
Evanston, Illinois
14. Hildebrand, W. (1953): Untersuchungen über die Wirkung des Spermasol-Verdünners auf das Bullensperma im Reagenzglas im Vergleich zu anderen Verdünnungsflüssigkeiten.
Diss. Hannover.
15. Hinz, L. (1951): Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten und Desinfektionsmittel auf das Bullensperma im Reagenzglas.
Diss. Hannover
16. Hoelzer, H. und Hanske, W. (1953): Der Eidotterverdünner und seine Filtration.
Deutsche Tierärztl. Wochenschr., Beil. 2, 86.

17. Hurst, V. und Carolina, S. (1951):
The storage of egg yolk - sodium citrate
semen diluter
Jour. of Dairy Sci. 490
18. Karrasch, E. (1951): Untersuchungen über die Wirkung verschiedener
Verdünnungsflüssigkeiten und hoher Verdünnungs-
grade auf das Bullensperma im Reagenzglas.
Diss. Hannover
19. Kobert, R. (1952): Über die Verdünnung von Bullensperma mit
Spermasol.
Tierärztl. Umschau 7, 30
20. Kok, C.N. (1953): Die Lebensdauer der Bullenspermien in vitro
Tijdschr. Diergeneesk. 78, 903
21. Leidl, W. und Rüsse, M. (1956):
Der Einfluß der Tiefkühlung auf den Sauerstoff-
verbrauch von Bullensperma.
Deutsche Tierärztl. Wochenschr., Beil. 10
22. Polge, C. (1956): Konservierung von Stiersamen bei sehr niederen
Temperaturen.
Vortrag, gehalten bei der Fachtagung für künst-
liche Befruchtung, 18./19. August in Wels,
Österreich.
23. Polge, C. und Lovelock, J.E. (1952):
Preservation of bull semen at -79°C .
Vet. Rec. 64, 396
24. Rasbech, N.O. (1954): Dybfrysning af pattedyrspermier
Nord. Veterinärmed. 6, 199
25. Rowson, L.E.A. (1952): Die Tiefkühlung des Samens
Zootechnia, 1, 6-7.

26. Rulffes, R. (1951): Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas.
Diss. Hannover
27. Salisbury, G.W., Fuller, H.K., Willet, E.L. (1941):
Preservation of bovine spermatozoa in yolk-
citrate diluent and field results from its use.
Jour. of Dairy Sci. 905
28. Schiller, O. (1957): Die Verdünnung und Konservierung von Bullen-
sperma im Schrifttum.
Diss. Gießen
29. Schmidt, F.F. (1955): Vergleichende Untersuchungen über die Brauch-
barkeit einiger Verdünnungs- und Konservie-
rungsmittel für Rindersperma.
Diss. Gießen
30. Schwarz, G. (1949): Phosphat- und Zitrat-Verdünnungsmittel für
Rindersperma mit und ohne Eidotter.
Diss. Hannover
31. Ullner, W. (1953): Vergleichende Untersuchungen von Sperma-
verdünnern.
Tierärztl. Umschau 6, 275
32. Ullner, W. in Küst-Schaetz (1954):
Die Besamung beim Rind
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
33. Urbaschek, B. und Zoder, H.F. (1953):
Über die Samenkonservierung durch die Tief-
kühlmethode.
Tierärztl. Umschau 8, 448.
34. Wolfertz, J. (1953): Untersuchungen über die Wirkung verschie-
dener Pflanzenkolloide auf das Bullensperma
in vitro im Vergleich zum Eidotter-Spermasol
und Eidotterzitrat-Verdünner.
Diss. Hannover.

LEBENS LAUF

Am 1.11.1933 wurde ich, Jürgen Unshelm, als Sohn des Syndikus Dr. Erich Unshelm und seiner Frau Margarete, geb. Schmachtenberg in Dortmund geboren.

Ab 1940 besuchte ich die Volksschule und danach das humanistische Stadtgymnasium zu Dortmund und bestand dort 1954 die Reifeprüfung.

Mein tiermedizinisches Studium begann und beendete ich ohne Universitätswechsel in München. Die tierärztliche Prüfung bestand ich am 28.1.1959.

